

平成 24-26 年度厚生労働省 食品・安全確保研究事業 分担研究報告書

課題名：「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	倉園貴至	埼玉県衛生研究所
研究協力者	青木敦子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	松下明子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

研究要旨

薬剤耐性菌が健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として 2012 年から 2014 年に埼玉県内でヒト等から分離された食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行うとともに、ヒト及びイヌ・ネコ糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 453 株で型別不能を除くと 56 血清型に型別された。薬剤感受性では 171 株（37.7%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示し、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 2 株分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 356 頭、ネコ 87 頭および野生アライグマ 553 頭の検査を行い、イヌ 5 頭、ネコ 1 頭およびアライグマ 13 頭からサルモネラが分離された。イヌとネコを対象とした ESBL 産生菌の検索では 47 株が分離された。

赤痢菌では、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 6 株分離され、血清型は全て *S. sonnei* であった。フルオロキノロン剤耐性株が分離された患者にはインドやカンボジアへの渡航歴があった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 450 株が分離され、薬剤感受性試験では、450 株中 62 株（13.8%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性株が 2 株、フルオロキノロン剤耐性株が 1 株分離された。ヒト糞便からの ESBL 産生菌の検索では、720 検体中 52 検体から分離された。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した鶏肉、野菜等 307 検体を供試し、サルモネラは鶏肉 29 検体中 10 検体および豚肉 15 検体中 1 検体から、カンピロバクター

は鶏肉 29 検体中 12 検体、ESBL は鶏肉 25 検体中 15 検体並びに生力キ 8 検体中 2 検体から検出された。サルモネラは全株、カンピロバクター分離株は 1 株を除き供試薬剤のいずれかに耐性を示した。

食鳥肉のフキトリ調査では、出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査を実施し、カンピロバクターが 161 検体中 19 検体から、サルモネラは 1 検体から分離された。

A. 研究目的

近年、ヒトや食品等の周辺環境から分離されるサルモネラや大腸菌などの食中毒起因菌で、治療薬剤であるフルオロキノロン剤や第三世代セファロスポリンに対して抵抗を示す耐性菌の出現や増加が問題となっている。このような耐性菌がどのような経路でヒトに感染するのか、健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的としてヒト、食品および伴侶動物等から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。また、ヒト及びイヌやネコの糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

B. 研究方法

・ 供試菌株

1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例、集団食中毒事例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクター・赤痢菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。また、埼玉県衛生研究所に搬入された糞便を chromID™ ESBL Agar (ピオメリュー社製) に塗抹し、ESBL 産生菌の検索を行った。

2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サル

モネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。また、食肉からの ESBL 産生菌の検索も行った。

3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

4) 動物由来

伴侶動物のイヌやネコに加え、「埼玉県アライグマ防除実施計画」に基づき捕獲された野性化アライグマのサルモネラ分離を検討し、調査に供した。イヌ・ネコについてはヒト同様 ESBL 産生菌の検索を行った。

・ 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク: BBL) を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌はクロラムフェニコール (CP; 30 µg)、ストレプトマイシン (SM; 10 µg)、テトラサイクリン (TC; 30 µg)、カナマイシン (KM; 30 µg)、アミノベンジルペニシリン (ABPC; 10 µg)、ナリジクス酸 (NA; 30 µg)、セフォタキシム (CTX; 30 µg)、シプロフロキサシン (CPFX; 5 µg)、ゲンタマイシン (GM; 10 µg)、ホスホマイシン (FOM; 50

μg)、ノルフロキサシン(NFLX:5 μg)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST;25 μg)の12薬剤で、ヒト由来株についてはイミペネム(IMP:10 μg)、アミカシン(AMK:30 μg)、メロペネム(MEPM:10 μg)、スルフィソキサゾール(Su:250 μg)の4薬剤を加えた16薬剤を供試した。カンピロバクターはテトラサイクリン(TC;30 μg)、ナリジクス酸(NA;30 μg)、シプロフロキサシン(CPFX;5 μg)、ノルフロキサシン(NFLX:5 μg)、オフロキサシン(OFLX:5 μg)、エリスロマイシン(EM:15 μg)の6薬剤を供試した。

C. 研究結果

(1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で2012年から2014年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表1に示した。分離された453株は型別不能を除き56血清型に型別され、*S. Enteritidis*が49株と最も多く分離された。次いで*S. Saintpaul*が39株、*S. Thompson*が27株であった。

この453株について薬剤感受性試験を実施した結果、171株(37.7%)が16薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された*S. Enteritidis*は49株中28株(57.1%)が耐性を示した。*S. Schwarzengrund*は供試20株中1株を除き耐性であった。

分離株の区分別耐性パターンを表2に示す。NA耐性が28株と最も多く、次いでSM・TC・Su耐性が19株、SM・TC・KM・

Su耐性が16株であった。また、CTX耐性株が4株、フルオロキノロン剤耐性株が2株分離された(表3)。CTX耐性菌は同じ08群のサルモネラであるが、06因子の有無により血清型名が異なる2株から分離された。この2株が保有する耐性遺伝子は同じCTX-M-2であった。フルオロキノロン耐性株は、CP・SM・TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX・SXT・Suの9薬剤に耐性を示す血清型*S. Kentucky*が分離され、そのMLST型はST198であった。

(2) 動物由来サルモネラ

イヌ、ネコおよび野生アライグマのサルモネラ保菌状況調査の結果を表4に示す。イヌ356頭、ネコ87頭および野生アライグマ553頭の検査を行い、イヌ5頭(1.4%)、ネコ1頭(1.1%)およびアライグマ13頭(2.4%)からサルモネラが分離された。薬剤感受性は、アライグマから分離された1株を除き供試した16薬剤に対して感受性を示した。

(3) 動物由来ESBL産生菌

イヌとネコを対象としたESBL産生菌の検索では42株が分離された。ESBL産生菌の検索ではイヌ354頭中40頭(11.3%)、ネコ84頭中2頭(2.4%)から分離された(表5)。イヌ由来株はCTX-M-1group、CTX-M-8groupあるいはCTX-M-9groupのいずれかを、ネコ由来株はCTX-M-1groupかCTX-M-2groupのいずれかの耐性遺伝子を保有していた。ディスク法による感受性試験では、フルオロキノロン剤にも耐性を示す株が複数株確認された。

(4) 赤痢菌

赤痢菌では、CTX耐性株が4株、フル

オロキノロン剤耐性株が 6 株分離され、血清型は全て *S. sonnei* であった。CTX 耐性株は同じトルコツアーに参加した 4 名から分離され、薬剤耐性パターンも耐性遺伝子 (CTX-M-1group) も同一であった。フルオロキノロン剤耐性株が分離された患者にはインドやカンボジアへの渡航歴があった (表 6)。

(5) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で 2012 年から 2014 年に、ヒトから分離された腸管出血性大腸菌 450 株の血清型別分離状況を表 7 に示した。最も多く分離された血清型は、O157:H7 が 316 株、次いで、O26:H11 が 65 株、O157:H- が 29 株の順であった。分離 450 株の薬剤感受性試験の結果、供試した 16 薬剤のいずれかに耐性であったのは 62 株 (13.8%) であった (表 8)。CTX 耐性株が 2 株、フルオロキノロン剤耐性株が 1 株分離された。CTX 耐性株は、O121:H19(VT2) で CTX-M-65 を保有する株と、O26:H1 (VT1) で CTX-M-14 を保有する株であった。この O26:H1 は 23 名の感染者が確認された保育園集団感染事例で分離されたが、CTX 耐性株は 1 株のみであった。フルオロキノロン剤耐性株は、OUT:H- (VT1) であった。CTX 耐性株は腹痛、下痢、血便の症状を呈した患者から分離されたが、フルオロキノロン剤耐性株は無症状の業態者検便受診者から分離された。

(7) ヒト由来 ESBL 産生菌

ESBL 産生菌の検索では、720 検体中 52 検体から分離された (表 9)。CTX-M-9group 保有株が 29 株と最も多かった。ディスク法による感受性試験で

は、CTX のみならずフルオロキノロン剤に耐性を示す株が複数分離された。

(8) カンピロバクター

2012 年から 2014 年に食中毒疑いで搬入された事例の臨床材料から分離したカンピロバクターは 96 株で、すべて *C. jejuni* であった (表 10)。薬剤感受性試験では 96 株中 63 株 (65.6%) が供試した 6 薬剤のいずれかに耐性を示し、そのうち 50 株がフルオロキノロン剤耐性であった。

(9) 食品からの分離

2012 年 7 月から 2015 年 1 月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計 307 検体を購入し、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、カンピロバクターの検査を行った。その結果、サルモネラは鶏肉 29 検体中 10 検体および豚肉 15 検体中 1 検体から、カンピロバクターは鶏肉 29 検体中 12 検体、サルモネラは全株、カンピロバクター分離株は 1 株を除き供試薬剤のいずれかに耐性を示し、腸管出血性大腸菌はいずれの検体からも検出されなかった (表 11)。

食肉からの ESBL 産生菌の検索では、鶏肉 25 検体中 15 検体並びに生カキ 8 検体中 2 検体から検出された (表 12)。

(10) 食鳥処理場由来

食鳥処理場での出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査で、カンピロバクターが 161 検体中 19 検体から、サルモネラは 1 検体から分離された。薬剤感受性は、サルモネラが KM・GM に耐性を示し、カンピロバクターは 9 株がフルオロキノロン剤に耐性であった (表 13)。

D. 考察

ヒト由来サルモネラで供試 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示したのは、453 株中 171 株(37.7%)であったが、年別にみると 2012 年は 35.7%、2013 年は 35.1%、2014 年は 43.0%であり、耐性率の上昇が見られた。また、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 2 株分離されたが、全て異なる血清型であり、その拡がり懸念される。フルオロキノロン剤耐性の *S. Kentucky* は、県内での検出は 2009 年から 2014 年にかけてわずか 1 株であったが、アフリカ東部からヨーロッパやアメリカ等に拡がりをもせている多剤耐性の *S. Kentucky* と同じ MLST 型 ST198 であった。今後ともその動向を注視する必要がある。

動物由来では、イヌ、ネコおよび野生化アライグマからサルモネラが分離されたが、フルオロキノロン剤や CTX に対して耐性を示す株は分離されていない。しかし、2006 年にはネコからフルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が分離されており、伴侶動物のイヌやネコ、ヒトの生活圏を浸食する野生化アライグマはヒトへの影響も少なくないことから、今後も監視していく必要がある。

腸管出血性大腸菌は、供試 16 薬剤に対する耐性率は 13.8%であったが、分離株全てが耐性であった O111:H-のように耐性率が高い血清群があった。

ヒトやイヌおよびネコの糞便を材料と

した ESBL 産生菌の検索では、ディスク法による感受性試験で、2012 年と 2013 年にディスク法で CTX とフルオロキノロン剤耐性を示す大腸菌 O25:H4 が分離されていた。近年、CTX-M-15 産生大腸菌 ST131 という特定のクローンの検出数が世界中で増加している。この大腸菌の抗原は O25:H4 であることが多く、今後は、それらとの関連を検討する必要があると思われる。

E. 結論

ヨーロッパやアメリカでその拡がり懸念される MLST 型 ST198 の *S. Kentucky* が初めて県内で確認され、CTX とフルオロキノロン剤耐性を示す大腸菌 O25:H4 が分離された。フルオロキノロン系薬剤やセフェム系薬剤の耐性株の検出も続いていることから、健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、今後とも耐性菌の動向調査を継続していくことが重要である。

F. 健康危機情報

サルモネラ、腸管出血性大腸菌および赤痢菌感染事例において、CTX 耐性菌やフルオロキノロン剤耐性株が分離された。

G. 研究発表

準備中

H. 知的所有権の取得状況

なし